

УДК 576.893.192.1 + 57.083.13

© 1995

**CRYPTOSPORIDIUM PARVUM (APICOMPLEXA: SPOROZOA, COCCIDIA) –  
ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ БОЛЬШОЙ МАССЫ ООЦИСТ**

**Т. В. Бейер, Н. В. Сидоренко, М. В. Григорьев**

Настоящее сообщение посвящено результатам работы по оптимизации метода обогащения фекальных проб, содержащих ооцисты криптоспоридий, с помощью ступенчатого градиента плотности перколлы, впервые предложенного Вальдманом и др. (Waldman e. a., 1986). В задачу работы входило: получение и очистка большой массы ооцист *C. parvum*, а также оценка пригодности такого материала для последующего заражения модельных лабораторных животных.

Историю изучения кокцидий рода *Cryptosporidium* Tyzzer, 1910 можно графически изобразить в виде взлетов и падения кривой интереса к этому объекту со стороны исследователей на протяжении более 80 лет. Лишь с середины 80-х годов XX века наступает период неугасающего интереса к криптоспоридиям, о чем свидетельствуют и сотни публикаций, исходящие от специалистов разных научных направлений: от зоологов, ветеринаров и медиков до иммунологов и молекулярных биологов (Бейер, 1986, 1989; Чайка, Бейер, 1988; Bird, Smith, 1980; Angus, 1983; Current, 1984, 1989; Navin, Juranek, 1984; Fayer, Ungar, 1986; Pohjola-Stenroos, 1986; Chermette, Boufassa-Ouzrout, 1988; Tzipori, 1988).

В своем оригинальном светооптическом описании криптоспоридий Тиццер (Tyzzer, 1910, 1912) оказался во многом прав в том, что касалось их морфологии и жизненного цикла. Однако из-за очень мелких размеров эндогенных стадий развития криптоспоридий (3–5 мкм в диаметре) Тиццер принял их ошибочно за внеклеточных кокцидий, которых он рассматривал как промежуточную форму „в эволюции от грегариин к кокцидиям”. Столь же ошибочным оказалось и суждение Тиццера о непатогенности криптоспоридий для хозяина (грызунов).

Впоследствии на протяжении 80-х годов в серии исследований была убедительно доказана внутриклеточная, хотя и экстрацитоплазматическая (не внеклеточная!), локализация эндогенных стадий развития криптоспоридий (Brändler, 1982; Göbel, Brändler, 1982; Uni, e. a., 1987; Lumb e. a., 1988; Ostrovska, Paperna, 1990; Бейер, Сидоренко, 1991). В свою очередь изучение патогенности криптоспоридий, в частности широко распространенного вида *C. parvum*, привело к признанию их оппортунистической природы, т. е. зависимости размаха паразитарной инфекции от иммунного состояния хозяина (Meisel e. a., 1976; Lasser e. a., 1979; Goldfarb e. a., 1982; Sloper e. a., 1982; Current e. a., 1983; Miller e. a., 1983; Current, 1984; Hojlyng, Jensen, 1988; Ungar e. a., 1991; McDonald e. a., 1992; Rohlman e. a., 1993).

Именно с этого, прикладного, значения криптоспоридий начался новый взлет интереса к изучению криптоспоридий во многих странах мира. К настоящему времени *C. parvum* известен как широко распространенный возбудитель холероподобного заболевания человека и животных, протекающего в виде диареи разной силы.

У пациентов с нормальной иммунной системой такая диарея ограничена во времени, тогда как при разных формах иммунодефицита, в том числе при СПИДе, нередко оказывается профузной и не ограниченной во времени (Current, 1989). Важным негативным последствием криптоспоридиоза является значительное обезвоживание организма хозяина, угрожающее не только здоровью, но и жизни пациента.

Указанное обстоятельство в свою очередь объясняет специфику современных исследований по криптоспоридиям, связанную с поисками эффективных методов диагностики возбудителя. В таких работах широко используется эндогенная стадия развития паразита – ооциста. Ооцисты в больших количествах изолируются из фекалий или кишечного содержимого как спонтанно, так и экспериментально зараженных животных (Luft e. a., 1987; Current, 1990; Laxer e. a., 1991; Chrisp, LeGendre, 1994).

Было замечено, что в фекальные выделения криптоспоридиозных животных, кроме ооцист, покрытых плотными оболочками, могут попадать также и развивающиеся эндогенные стадии (Snodgrass e. a., 1984). Этому могут способствовать по крайней мере два важных обстоятельства, имеющих место при криптоспоридиозе: локализация эндогенных стадий в дистальной части энтероцита (экстрацитоплазматическая локализация), а также сильный механический смыв таких стадий быстрым током жидкости при диарее. Эта сторона криптоспоридиозной инвазии заслуживает более детального изучения.

Наш собственный опыт работы с фекальным материалом при изучении криптоспоридий также наводит на мысль о качественной и количественной неоднородности такого материала. Об этом свидетельствует выделение стадий не только разного размера (Бейер, Сидоренко, 1993), но и разная адсорбция кислотоустойчивого красителя (карболового фуксина) такими стадиями, что может отражать различия в структуре внешних покровов, по-разному сорбирующих краситель.

При проведении скрининга на зараженность криптоспоридиями на прямом мазке свежего материала экспериментатор нередко сталкивается с негативными результатами. Однако отсутствие паразитов в одном и даже нескольких мазках не может служить доказательством их отсутствия во всей пробе. Для целей диагностики криптоспоридий даже у слабо зараженных организмов необходимо иметь удобные и недорогие методы обогащения фекальных проб.

В современной литературе описан целый ряд таких методов, в том числе и в отношении криптоспоридий (Current e. a., 1983; Ma, Soave, 1983; Pavlasek, 1984; Hart, Baxby, 1985; Baxby, Hart, 1986; Arrowood, Sterling, 1987; Current, 1990). При наличии преимуществ в одном отношении многие методы бывают лишены их в другом. Последнее касается ощутимых трудностей в приобретении дорогостоящего набора реактивов, высокой стоимости самой процедуры исследования, возможной потери инвазионности возбудителя в ходе очистки и т. д. С учетом всех обстоятельств мы остановили свой выбор на методе с использованием ступенчатого градиента плотности перколлы (Waldman e. a., 1986). Ооцисты *Cryptosporidium* spp., очищенные перколлом, были успешно использованы при заражении гнотобионтных поросят (Makin, Tzipori, 1990; Tzipori e. a., 1982), а также при инокуляции культуры тканей и куриных эмбрионов.

В задачу данного исследования входило, во-первых, оптимизировать перколовый метод для получения больших масс очищенных ооцист *C. parvum* и, во-вторых, проверить пригодность очищенных таким образом ооцист для последующего заражения модельных лабораторных животных и воспроизведения в них эндогенного развития криптоспоридий.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ооцисты *C. parvum* выделялись из фекальных проб, полученных от 7–12-дневных спонтанно зараженных телят из животноводческих хозяйств Ленинградской обл. в течение 1993–1994 гг. Очистка и концентрация ооцист проводились при комнатной температуре в два этапа. Последовательность процедур схематически изображена на рис. 1, 1–6, а их описание дается в тексте.<sup>1</sup>

На первом этапе (рис. 1, 1–4) все процедуры проводились в центрифужных пробирках объемом 20 мл. Ооцисты концентрировали путем осаждения в фосфатном буфере pH 7.2, приготовленном на физрастворе (PBS). Гомогенат фекалий получали при смешивании испытуемой пробы с PBS в соотношении 1 : 5. Приблизительно 15 мл гомогената помещали в пробирку (1) и центрифугировали при ускорении, равном 500g в течение 10 мин. Супернатант удаляли (2), а к осадку добавляли 12 мл PBS и 3 мл наркозного эфира (3). Пробирку интенсивно взбалтывали до полного растворения липидов, содержащихся в фекальной пробе.

10-минутное центрифугирование полученной смеси при том же ускорении приводило к формированию в пробирке четырех отчетливых слоев, включавших растворитель (эфир), пробку из детрита, PBS и осадок в виде беловатого налета на дне пробирки (4). Супернатант (три верхних слоя) отбрасывали, а из осадка готовили мазки на предметных стеклах, которые окрашивали карболовым фуксином по Цилю–Нильсену или генциановым фиолетовым (экспресс-метод) по Сидоренко (1988).

На втором этапе очистки (рис. 1, 5, 6) все процедуры проводились в конических центрифужных пробирках объемом 10 мл. Этот этап включал выделение ооцист из осадка, выделенного на первом этапе работы, в прерывистом (ступенчатом) градиенте плотности перколла.

Коммерческий раствор перколла (Percoll, Pharmacia LKB, Biotechnology) с начальной плотностью 1.13 г/мл разбавляли с помощью 0.15 M NaCl для получения производных растворов с соответствующими плотностями 1.04 и 1.08 г/мл. Для формирования градиентов с резкой границей раздела (5) 3 мл перколла с плотностью 1.04 г/мл аккуратно наслаивали с помощью стеклянной пипетки на равный объем перколла с плотностью 1.08 г/мл, ранее помещенного в ту же пробирку. Затем на верхний слой перколла наслаивали 0.5 мл осадка, содержащего ооцисты, и все вместе центрифугировали в течение 10 мин при ускорении, равном 250 g. Центрифугирование приводило к образованию трех отчетливых зон распределения испытуемого материала: двух зон соответственно над верхним (1.04 г/мл) и нижним (1.08 г/мл) слоями перколла и одной на дне пробирки (6).

Каждую из этих зон отсасывали пипеткой отдельно и далее разбавляли в 10 объемах PBS, после чего центрифугировали в течение 10 мин при ускорении 500g.

Во всех случаях после центрифугирования супернатант отбрасывали, а осадок отмывали от PBS в 10 объемах водопроводной зоны. Мазки из каждой пробы исследовали после окраски карболовым фуксином или генциановым фиолетовым. Подсчет ооцист проводили в камере Горяева.

Для заражения 6–9-дневных крысят концентрированную взвесь ооцист разбавляли в несколько раз PBS так, чтобы доза заражения одного крысенка была в среднем 20 000 ооцист. Обычно для заражения использовали свежеочищенную взвесь ооцист. В тех случаях, когда для заражения применяли взвесь, ранее хранившуюся в 2.5 %-ном растворе  $K_2Cr_2O_7$  на PBS при 4° в течение 2–3 сут, отмыва-

<sup>1</sup> Отработка техники очистки ооцист *C. parvum* составляет часть курсовой работы студента Санкт-Петербургского университета М. В. Григорьева, выполнявшейся в 1993–1994 гг.

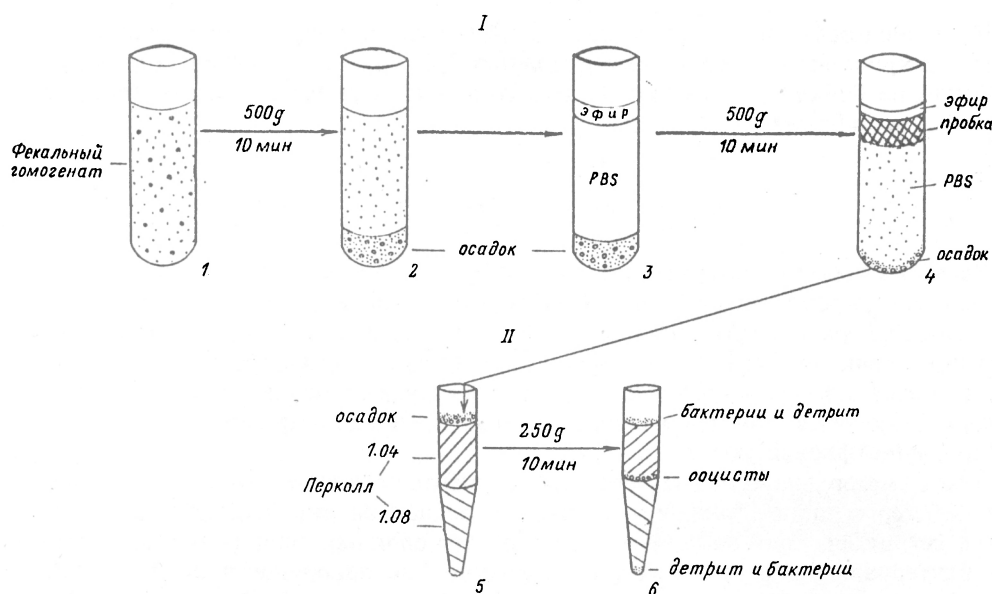


Рис. 1. Последовательность процедур очистки и концентрации ооцист *C. parvum* в градиенте плотности перколлы.

Стрелки — направление основных этапов работы, 1–6.  
Объяснение в тексте.

Fig. 1. The consequence of steps for cleaning and concentrating oocysts of *C. parvum* in a discontinuous percoll density gradient.

ние от бихромата калия проводили путем трехкратного центрифугирования в PBS в течение 10 мин с ускорением 500 g.

Вскрытие крысят проводили на 4–5-е сутки после заражения. Этот срок был подобран экспериментально, исходя из необходимости получения максимального разнообразия эндогенных стадий развития *C. parvum* на одном и том же препарате. Наиболее сильно зараженным обычно оказывался дистальный отдел тонкой (подвздошной) кишки, на расстоянии 2–7–14 см от червеобразного отростка, т. е. примерно в 35–37 см от желудка, при общей длине тонкой кишки у 14–20-дневных крысят 40–42 см. Скрининг зараженности отдельных участков кишки осуществляли на мазках-отпечатках, которые фиксировали абсолютным метанолом и окрашивали экспресс-методом 1%-ным раствором генцианового фиолетового (Сидоренко, 1988). О характере и степени заражения судили по количественному соотношению на препаратах ооцист, меронтов, гамонтов и других эндогенных стадий развития *C. parvum*.

Небольшие кусочки кишки (4–5 мм), вырезанные из зараженных участков, помещали для охлаждения в максимально сжатые сроки после вскрытия животных в заливочную среду Брайта (Embedding Compound Bright Cryo-M-Bed) и немедленно замораживали при помощи аэрозоля-криоспрея, содержащего дихлор-дифторметан, или фреон 12. Образовавшийся замороженный блок немедленно помещали в камеру криостата фирмы Брайт (Bright Instrument Company Limited), внутри которой устанавливалась температура не ниже  $-25^{\circ}$ . Спустя 30–60 мин из блока замороженной кишки готовили срезы толщиной 7 мкм. Такие срезы собирали и монтировали на „теплые” (т. е. ранее хранившиеся при комнатной температуре) покровные стекла. Смонтированные срезы вынимали из камеры и высушивали в струе воздуха при комнатной температуре.

Изучение морфологии эндогенных стадий *C. parvum* и зараженной кишки проводили на криостатных срезах, фиксированных 4 %-ным формалином или кальций-формолом по Бейкеру, в течение 10–15 мин при 4°, и окрашенных гематоксилином-эозином по Бемеру.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На прямых мазках исходных фекальных проб, полученных от спонтанно зараженных телят, кроме ооцист *C. parvum* наблюдалось значительное количество бактериальной флоры и детрита (рис. 2). В результате проведения первого этапа концентрации и очистки ооцист с помощью PBS и эфира количество ооцист, выявляемых на мазках, заметно превышало таковое на прямых мазках исходного материала, однако такие ооцисты все еще оставались сильно загрязнены детритом и бактериальной флорой (рис. 3, а).

Анализ материала из разных фракций градиента плотности перколла, полученного на втором этапе очистки, показал, что осадок на дне пробирки содержал только детрит, фракция на поверхности верхнего слоя перколла (1.04 г/мл) включала бактериальную флору и детрит, а фракция на поверхности нижнего слоя (1.08 г/мл) состояла из ооцист *C. parvum* (рис. 1, б–8; рис. 3, б). Концентрация ооцист во взвеси перколлового материала после очистки достигала 1 млн и более в 1 мл взвеси.

Анализ мазков перколлового материала, окрашенных карболовым фуксином по Цилю–Нильсену, выявил значительное разнообразие оттенков в окраске выявляемых стадий, от бледно-розового до ярко-пурпурного, что лишь отчасти отражено на черно-белой фотографии (рис. 3, б).

Крысята-реципиенты, зараженные *per os* ооцистами *C. parvum*, очищенными перколлом, выделяли ооцисты нового поколения на 4–5–7-е сутки. По морфологическим и размерным характеристикам эти ооцисты соответствовали таковым *C. parvum*. При вскрытии зараженных крысят к концу препатентного периода (на 96 ч после заражения) в нижнем отделе подвздошной кишки наблюдалось скопление разных эндогенных стадий развития, в котором отчетливо идентифицировались как ооцисты (рис. 4, а), так и более ранние стадии – меронты и гамонты (рис. 4, б).

На криостатных срезах дистальной части подвздошной кишки крысят, зараженных материалом, очищенным перколлом, в дозе 20000 ооцист на одно животное, наблюдалась массивная колонизация ворсинок и крипт эндогенными стадиями развития паразита (рис. 5). Локализация криптоспоридий ограничивалась зоной щеточной каемки энтероцитов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее сообщение посвящено результатам работы по оптимизации метода обогащения фекальных проб, содержащих ооцисты криптоспоридий, с помощью ступенчатого градиента плотности перколла, впервые предложенного Вальдманом и другими (Waldman et al., 1986). В задачу работы входили: получение и очистка большой массы ооцист *C. parvum*, а также оценка пригодности такого материала для последующего заражения модельных лабораторных животных.

Все известные методы очистки и концентрации ооцист кокцидий можно разделить на две основные группы. В первой группе в качестве флотационных жидкостей используются насыщенные растворы различных солей (NaCl, ZnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>,

MgSO<sub>4</sub> и др.). Из-за разности в плотности ооцисты кокцидий всплывают на поверхность флотационной жидкости, откуда их можно снять с помощью металлической петли (Current e. a., 1983; Pavlasek, 1984; Baxby, Hart, 1986). Процедура флотации ускоряется при непродолжительном центрифугировании.

При всей очевидной доступности таких методов обогащения проб они обладают рядом серьезных недостатков, как-то: относительно небольшой выход ооцист, слабая очистка от бактериальной флоры и детрита, разрушающее воздействие на ооцисты самих флотирующих жидкостей при продолжительной инкубации.

Во второй группе методов используются ступенчатые градиенты плотности таких веществ, как сахароза или перколл (Neuman e. a., 1986; Waldman e. a., 1986). Пригодность ооцист *Cryptosporidium* sp., очищенных перколлом, для заражения животных была продемонстрирована в опытах на однодневных гнотобионтных поросятах (Makin, Tzipori, 1980; Tzipori e. a., 1982), а также при введении ооцист в культуру тканей и в куриные эмбрионы (Waldman e. a., 1986).

В наших опытах для заражения модельных лабораторных животных (крысята первых дней жизни) использовались ооцисты *C. parvum*, которые сконцентрировались на поверхности нижнего слоя перколла с плотностью 1.08 г/мл (рис. 1, б). Инокулум в дозе 20000 таких ооцист на одно животное не оказался сколько-нибудь токсичным для хозяина. Характер эндогенного развития паразита после инокуляции очищенных ооцист был прослежен на криостатных срезах нижних участков подвздошной кишки через 96 ч после заражения. Интенсивность инвазии была достаточно высокой, о чем свидетельствует массовая колонизация энтероцитов не только в зоне ворсинок, но и крипт (рис. 5). Таким образом, перколл как флотирующая жидкость не только позволяет получать значительные количества очищенных ооцист, но и не влияет сколько-нибудь отрицательно на их инвазионность.

Представляет интерес обнаружение ооцист, меронтов и гамонтов *C. parvum* на мазках фекального содержимого нижних отделов подвздошной кишки крысят через 96 ч после заражения, т. е. в конце препатентного периода (рис. 4). Известно, что у кишечных кокцидий родов *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Sarcocystis* и других во внешнюю среду с фекалиями выделяются только ооцисты как спорулированные, так и неспорулированные, но не эндогенные стадии. Выделение меронтов или гамонтов не характерно для указанных кокцидий и может рассматриваться как биологическая особенность криптоспоридий (Snodgrass e. a., 1984).

В плане обсуждаемой проблемы представляет интерес наблюдение на мазках ооцист, очищенных перколлом и окрашенных по Цилю–Нильсену, отчетливой мозаичности в окрашиваемости разных элементов мазка: от бледно-розового, почти прозрачного тона, до разных оттенков красного и ярко-пурпурного (рис. 3, б). Можно предположить, что самые сильно окрашенные элементы суть то, что обозначается в литературе как толстостенные ооцисты *Cryptosporidium* (Current, 1984), оболочки которых адсорбируют наибольшее количество красителя. Соответственно наиболее слабо окрашенными могли бы быть тонкостенные ооцисты *C. parvum*, если предположить, что это ооцисты, считающиеся ответственными за аутоинфекцию организма (Current, 1984). Однако внимательное рассмотрение содержимого мазков, приготовленных из фекальных проб от спонтанно зараженных телят, позволяет заключить, что, кроме собственно ооцист, покрытых оболочками, на них можно встретить и другие эндогенные стадии развития криптоспоридий, меронты и/или гамонты, подобные тем, которые также выявляются на мазках фекального содержимого нижнего отдела подвздошной кишки экспериментально зараженных крысят на 96-й час препатентного периода (рис. 4, б).

Такое предположение представляется правдоподобным, если принять во внимание

мание механическое смещение током жидкости при диарее дистально расположенных эндогенных стадий паразита и их попадание в просвет кишки. В ходе профузной диареи, которая является наиболее характерным признаком криптоспориоза, эндогенные стадии выносятся во внешнюю среду и могут попасть к другому хозяину, положив начало новой инвазии. Гамонты в силу их неспособности к самостоятельному движению при попадании в кишечник, по-видимому, сразу погибают. Напротив, меронты в тех же условиях, высвобождая мерозоитов, могут продолжить свое развитие, сократив в результате срок препатентного периода на одну или две бесполой генерации. Косвенным аргументом в пользу такой возможности служит отсутствие данных о стабильных сроках препатентного периода у *C. parvum*, который, также в отличие от других кишечных кокцидий, может колебаться от 2–3 до 4–7 сут и более. Эту особенность криптоспоридий отмечали и другие авторы, однако в связи с дозой заражения и возрастом хозяина (Eberhardt e. a., 1985; Vitovec, Koudela, 1988).

Поднятый нами вопрос о причинах мозаичности в окрашиваемости ооцист криптоспоридий по Циллю–Нильсену пока еще далек от окончательного решения. До сих пор неизвестно, какие именно вещества, составляющие стенку ооцисты, способны окрашиваться карболовым фуксином или другими кислотоустойчивыми красителями. До последнего времени идентификация ооцист в фекальных пробах с помощью красителей проводилась только в отношении кокцидий рода *Cryptosporidium* из-за их исключительно мелких размеров. Однако недавно, в поисках криптоспоридий на окрашенных мазках диарейных больных Ортегой и другими (Ortega e. a., 1993) был обнаружен еще один кишечный патоген человека кокцидийной природы, относящийся к роду *Cyclospora* Schneider, 1881. Эти кокцидии известны как паразиты многоножек, рептилий и насекомых (Wenyon, 1926; Pellérdy, 1974). Обнаружение в фекалиях человека неспорулированных ооцист *Cyclospora* исключает их попадание к нему транзитом от другого хозяина.

С позиций настоящей дискуссии самым удивительным в находке Ортеги и других (Ortega e. a., 1993) является то, что, как и в случае *C. parvum*, ооцисты *Cyclospora* тоже окрашивались в разные тона фуксина, от бледно-розового до темно-красного, с темными включениями. Авторы исследования не анализировали причины отмеченной ими очевидной мозаичности в окраске ооцист. Можно предположить, что в этом случае различия в окрашиваемости могли быть связаны со степенью споруляции выделенных ооцист и отражают изменения, происходящие в ходе споруляции в структуре защитных оболочек ооцист. Сопоставление данных по *Cyclospora* с нашими наблюдениями по *C. parvum* наводит на мысль, что вопрос о структуре защитных образований, формирующихся вокруг зигот кишечных кокцидий, нуждается в дальнейшем уточнении. Решению этого вопроса будет во многом способствовать получение большой массы очищенных перколлом ооцист криптоспоридий с помощью метода, успешно апробированного в данном исследовании.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Код проекта 93–04–21 621. „Межклеточное распознавание и взаимодействия у низших эукариот”.

#### Список литературы

- Бейер Т. В. Криптоспориоз животных (биология возбудителя) // Ветеринария. 1986. № 10. С. 40–45.  
Бейер Т. В. Клеточная биология споровиков, возбудителей протозойных болезней животных и человека. Л., 1989. 184 с.



- Бейер Т. В., Сидоренко Н. В. Электронно-микроскопическое исследование криптоспоридий. III. Паразито-хозяйинные отношения // Цитология. 1991. Т. 33. С. 18–23.
- Бейер Т. В., Сидоренко Н. В. Об еще одной биологической особенности кокцидий рода *Cryptosporidium* (Sporozoa: Apicomplexa) // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 4. С. 309–319.
- Сидоренко Н. В. Методы диагностики криптоспориоза. Микроскопическое выявление ооцист *Cryptosporidium* // Ветеринария. 1988. № 2. С. 48–50.
- Чайка Н. А., Бейер Т. В. Криптоспориоз: библиографический указатель отечественной и зарубежной литературы за 1907–1987 гг. Л., 1988. 55 с.
- Angus K. W. Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds: a review // J. Roy. Soc. Med. 1983. Vol. 76. P. 62–70.
- Arrowood M. J., Sterling C. R. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients // J. Parasitol. 1987. Vol. 73. P. 314–319.
- Baxby D., Hart C. A. The incidence of cryptosporidiosis: a two-year prospective survey in a children's hospital // J. Hyg. (Lond.). 1986. Vol. 96. P. 107–111.
- Bird R. G., Smith M. D. Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology // J. Pathol. 1980. Vol. 132. P. 217–233.
- Brandler U. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Entwicklung von *Cryptosporidium* sp. in Darm experimentell infizierten Mäuse: Inaugural Diss. München, 1982. 54 S.
- Chermette R., Boufassa-Ouzrout S. Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man. 2nd ed. Paris, 1988. 122 p. (Office Intern. Epizooties; Techn. Ser. N 5).
- Chrisp C. E., LeGendre M. Similarities and differences between DNA of *Cryptosporidium parvum* and *C. wrairi* detected by the polymerase chain reaction // Folia Parasitol. 1994. Vol. 41. P. 97–100.
- Current W. L. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis // Acquired immune deficiency syndrome. N. Y. 1984. P. 355–373.
- Current W. L. Cryptosporidiosis // New Strategies in parasitology Ed. K. P. W. J. McAdam. Churchill Livingstone, 1989. P. 257–273.
- Current W. L. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium* // Cryptosporidiosis of Man and Animals. / Ed. J. P. Dubey, C. A. Speer, R. Fayer. Ann Arbor, Michigan, 1990. P. 41–42.
- Current W. L., Reese N. C., Ernst J. V. e. a. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of an outbreak and experimental transmission // New Engl. J. Med. 1983. Vol. 308. P. 1252–1257.
- Eberhardt U., Boch J., Heine J. Parasitologische und klinische Untersuchungen der experimentell mit *Kryptosporidien* infizierten NMRI-Mäusen // Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 1985. Bd 98. S. 266–268.
- Fayer R., Ungar B. L. P. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis // Microbiol. Revs. 1986. Vol. 50. P. 458–483.
- Goldfarb J., Tanowitz H., Grossman R. e. a. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) // MMWR. 1982. Vol. 31. P. 589–593.
- Göbel E., Brandler U. Ultrastructure of microgametogenesis, microgametes and gametogony of *Cryptosporidium* sp. in the small intestine of mice // Protistologica. 1982. Vol. 18. P. 331–344.
- Hart C., Baxby D. Cryptosporidiosis in immunocompetent patients // N. Engl. J. Med. 1985. Vol. 313. P. 1018–1019.
- Heyman M., Shigekuni L., Amman A. Separation of *Cryptosporidium* oocysts from food debris by density gradient centrifugation and glass bead columns // J. Clin. Microbiol. 1986. Vol. 23. P. 789–791.
- Hojlyng N., Jensen B. N. Respiratory cryptosporidiosis in HIV-positive patients // Lancet. 1988. P. 590–591.
- Lasser K. H., Lewin K. J., Tynning F. W. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia // Hum. Pathol. 1979. Vol. 10. P. 234–240.
- Laxer M. A., Timblin B. K., Patel R. J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction // Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1991. Vol. 45. P. 688–694.
- Luft B. J., Payne D., Woodmansee D., Kim C. W. Characterization of the *Cryptosporidium* antigens from sporulated oocysts of *Cryptosporidium parvum* // Infect. Immun. 1987. Vol. 55. P. 2436–2441.
- Lumb R., Smith K., O'Donoghue P. J., Lanser J. A. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells // Parasitol. Res. 1988. Vol. 74. P. 531–536.
- Ma P., Soave R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea // J. Infect. Dis. 1983. Vol. 147. P. 824–828.
- Makin T. J., Tzipori S. Inexpensive techniques for the production and maintenance of gnotobiotic piglets, calves and lambs // Austral. Vet. J. 1980. Vol. 56. P. 353–358.
- McDonald V., Deer R., Uni S. e. a. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Crypto-*



- sporidium parvum in adult immunocompetent or immunocompromised (Nude and SCID) mice // Infect. Immun. 1992. Vol. 60. P. 3325–3331.
- Meisel J. L., Perera D. R., Meligro C., Rubin C. E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient // Gastroenterology. 1976. Vol. 70. P. 1156–1160.
- Miller R. A., Holmberg R. E., Clausen C. R. Life-threatening diarrhea caused by *Cryptosporidium* in a child undergoing therapy for acute lymphocytic leukemia // J. Pediatr. 1983. Vol. 103. P. 256–259.
- Navin T. R., Juranek D. D. Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review // Revs. Infect. Dis. 1984. Vol. 6. P. 313–327.
- Ortega Y. R., Sterling C. R., Gilman R. H. e. a. Cyclospora species – a new protozoan pathogen of humans // New Engl. J. Med. 1993. Vol. 328. P. 1308–1312.
- Ostrovskaya K., Paperna I. *Cryptosporidium* sp. of the starred lizard *Agama stellio*: ultrastructure and life cycle // Parasitol. Res. 1990. Vol. 76. P. 712–720.
- Pavlassek I. F. First record of developmental stages of *Cryptosporidium* sp. in various organs of experimentally infected mice and spontaneously infected calves // Folia Parasitol. 1984. Vol. 31. P. 191–192.
- Pellerdy L. P. Coccidia and coccidiosis. Budapest, 1974. 959 p.
- Pohjola-Stenroos S. Diagnostic and epidemiological aspects of *Cryptosporidium* infection, a protozoan infection of increasing veterinary public health importance: Acad. Diss. Helsinki, 1986.
- Rohlfman V. C., Kuhls T. L., Mosier D. A., Crawford D. L., Greenfield R. A. *Cryptosporidium parvum* infection after abrogation of natural killer cell activity in normal and severe combined immunodeficiency mice // J. Parasitol. 1993. Vol. 79. P. 295–297.
- Sloper K. S., Dourmashkin R. R., Bird R. B. e. a. Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency // Gut. 1982. Vol. 23. P. 80–82.
- Snodgrass D. R., Angus K. W., Gray E. W. Experimental cryptosporidiosis in germfree lambs // J. Comp. Pathol. 1984. Vol. 94. P. 141–152.
- Tyzzer E. E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse // J. Med. Res. 1910. Vol. 23. P. 487–509.
- Tyzzer E. E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse // Arch. Protistenk. 1912. Bd 26. S. 394–412.
- Tzipori S. Cryptosporidiosis in perspective // Adv. Parasitol. 1988. Vol. 27. P. 63–129.
- Tzipori S., Smith M., Makin T., Halpin C. Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium* sp. purified from calf faeces // Vet. Parasitol. 1982. Vol. 11. P. 121–126.
- Ungar B. L. P., Kao T. C., Burris J. A., Finkelman F. D. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN $\gamma$  and CD4 $^{+}$  T lymphocytes in protective immunity // J. Immunol. 1991. Vol. 147. P. 1014–1022.
- Uni S., Iseki M., Maekawa T. e. a. Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (Strain RN66) parasitizing the murine stomach // Parasitol. Res. 1987. Vol. 74. P. 123–132.
- Vitovec J., Koudela B. Location and pathogenicity of *Cryptosporidium parvum* in experimentally infected mice // J. Vet. Med. 1988. Vol. 35. P. 515–524.
- Waldman E., Tzipori S., Forsyth J. R. L. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient // J. Clin. Microbiol. 1986. Vol. 23. P. 199–200.
- Wenyon C. M. Protozoology. London, 1926. Vol. 2. 1563 p.

ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, 194064

Поступила 14.11.1994

# CRYPTOSPORIDIUM PARVUM (APICOMPLEXA: SPOROZOA, COCCIDIA) – OPTIMIZATION OF METHODS FOR OBTAINING LARGE NUMBERS OF OOCYSTS

T. V. Beyer, N. V. Sidorenko, M. V. Grigorjev

**Key words:** *Cryptosporidium parvum*, oocyst; method, percoll.

## SUMMARY

The Waldman e. a. (1986) method of separation of *Cryptosporidium* spp. oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient appeared a method of choice for obtaining large numbers of oocysts of *C. parvum* free of fecal contamination. Feces of 7–12 day old calves, spontaneously infected with *C. parvum*, were concentrated and purified by the above technique. The purified oocysts were shown

to be infectious by inoculation of 6-9 day old rats with an average dose of 20 000 oocysts per animal. The rats shed oocysts after 4 days. At necropsy on day 4 postinoculation, the pattern of endogenous development appeared normal, when examined on frozen sections of fresh tissue, using the Bright cryostat, stained with hematoxylin and eosin.

Samples of the clean sediment, presumably containing only oocysts of *C. parvum*, were smeared and stained with carbol fuchsin after Ziehl-Neelsen, and with gentian violet after Sidorenko (1988). With the latter technique, an intense gentian violet staining screened all the constituents of the smear, except the oocysts, which being „negatively stained” looked as small transparent spheres 4-5 mkm in diameter. But of special interest was the reaction of the smeared organisms with carbol fuchsin. Some organisms stained dark red and had a variable number of dark granules, seemingly on the surface; whereas others stained light reddish, if at all, and appeared as transparent spheres. It does not seem unlikely that the sediment, resulting from the final step of percoll separation, may contain, besides oocysts, some other endogenous stages (meronts, gamonts, thin-walled oocysts) that appeared in the lumen of the intestine because of an intense flow of diarrheal fluid during cryptosporidiosis. Unlike the thick walled oocysts, other endogenous stages are not covered with protective walls and thus fail to absorb acid fast staining. Segmented meronts were obviously observed on the rat fecal smears 96 hours after infection. This observation enables us to propose that newly infected hosts-recipients may obtain, with diarrheal fecal masses of infected donors, not only sporulated oocysts, but also some earlier developmental stages. Merozoites, released from the segmented meronts, could start in the intestine asexual rounds, thus shortening the resulting prepatent period. Fluctuations in prepatent period duration are characteristic of *Cryptosporidium* spp., and the above observation may be one of its explanations.

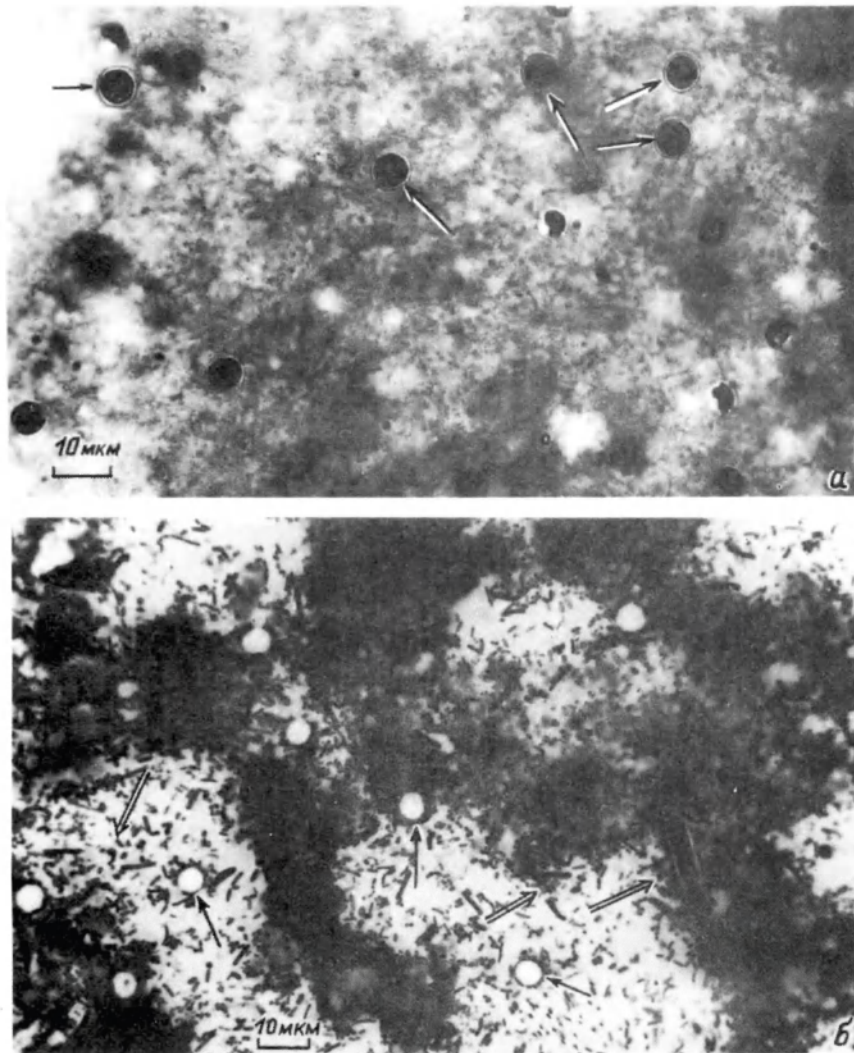


Рис. 2. Ооцисты *C. parvum* на прямых мазках фекальных проб от спонтанно зараженного 9-дневного теленка.

*a* — окраска карболовым фуксином по Цилю–Нильсену; *b* — негативное окрашивание ооцист генциановым фиолетовым по Н. В. Сидоренко. Стрелки — ооцисты *C. parvum*, двойные стрелки — бактерии и детрит.

Fig. 2. Oocysts of *C. parvum* in fecal smears from a spontaneously infected 9 day old calf.

Вклейка к ст. Т. В. Бейер.

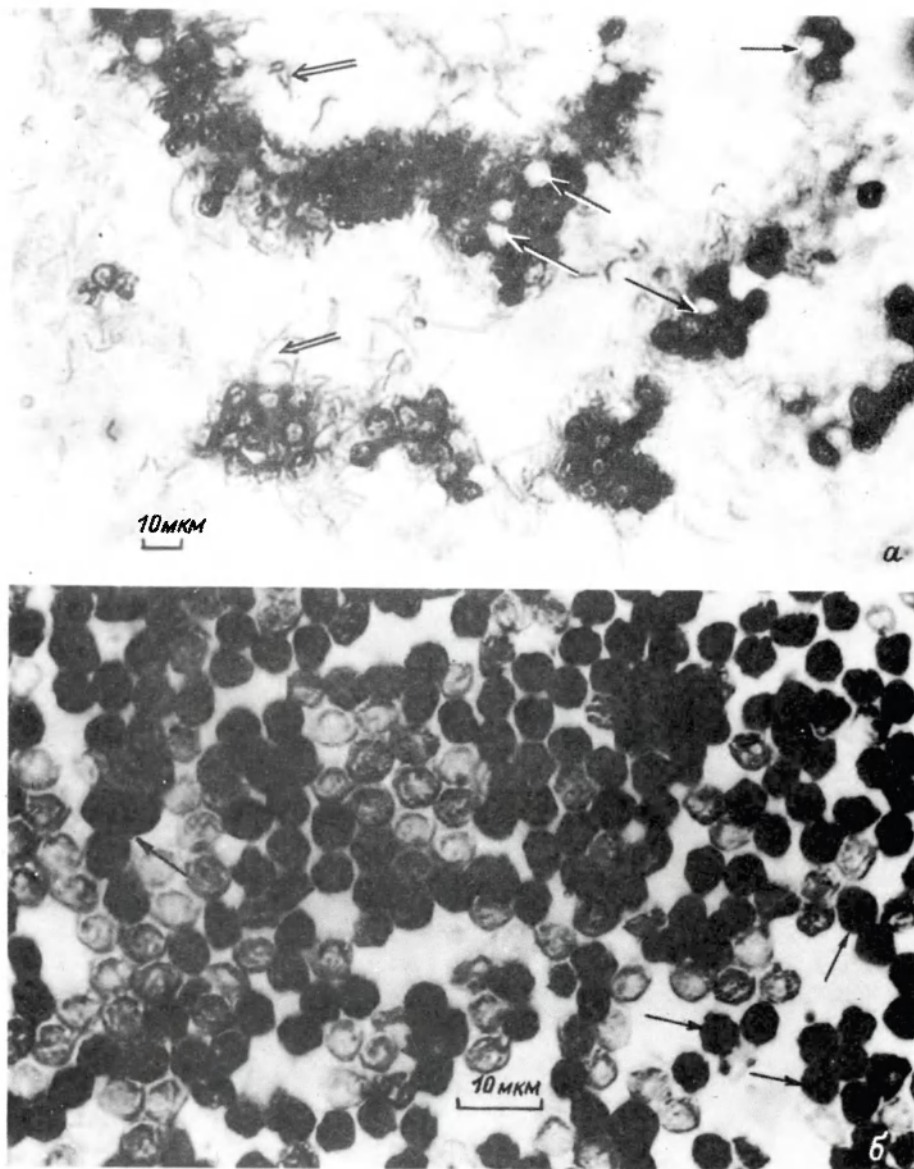


Рис. 3. Этапы процедуры концентрации и очистки ооцист *C. parvum* из фекальных проб от спонтанно зараженного 9-дневного теленка. Окраска генциановым фиолетовым (а) и карболовым фуксином (б).

а — первый этап с использованием PBS и эфира; б — второй этап с использованием градиента плотности перколлы в зоне 1,08 г/мл; стрелки — ооцисты *C. parvum*; двойные стрелки — детрит.

Fig. 3. Steps of the process of concentrating and cleaning of oocysts of *C. parvum* from fecal smears of a spontaneously infected 9 day old calf. Stained with Gentian violet (a) and Carbol fuchsin (b).

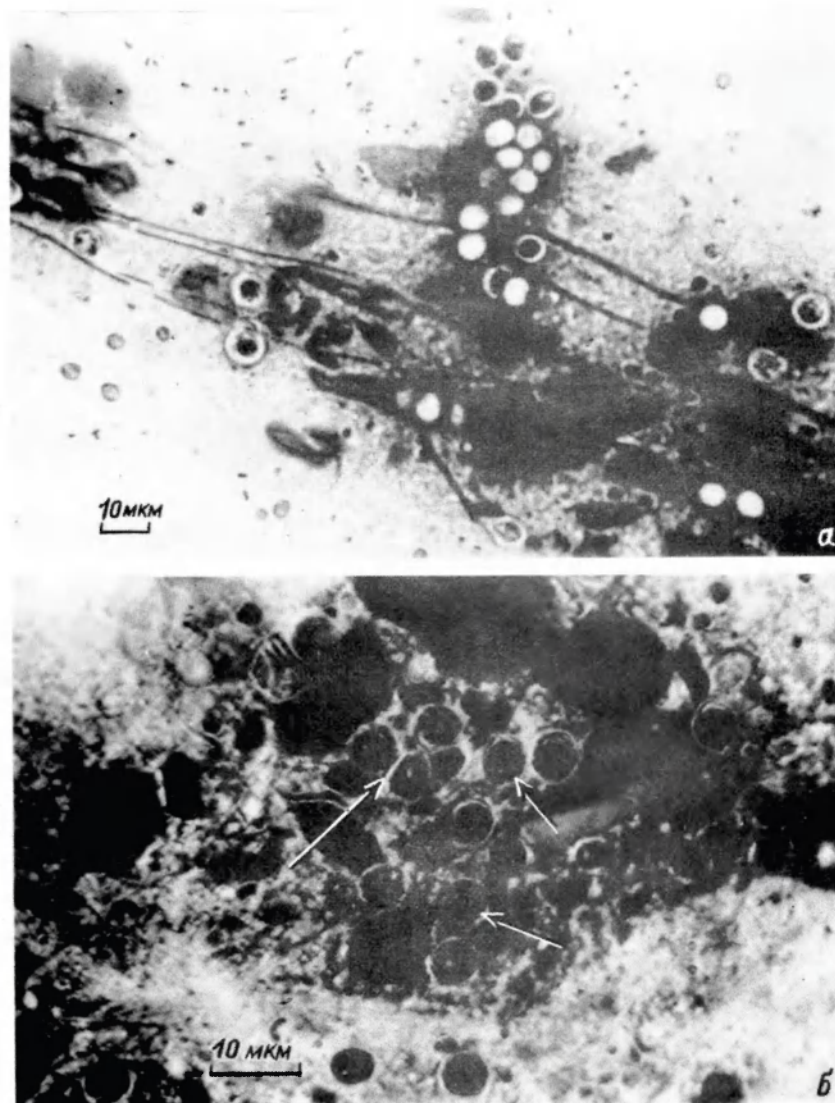


Рис. 4. Качественный состав изолятов содержимого нижнего отдела подвздошной кишки 2-недельного крысенка через 96 ч после заражения ооцистами *C. parvum*, очищенными в градиенте плотности перколлы. Негативное окрашивание генциановым фиолетовым.

*a* — ооцисты в фекальных массах (стрелки); *б* — скопление эндогенных стадий в просвете кишки (стрелки).

Fig. 4. A qualitative composition of isolates from the intestine of a 2 week old rat 96 hours after infection with oocysts of *C. parvum* cleaned in in a percoll discontinuous density gradient. Negative staining with Gentian violet.



Вклейка к ст. Т. В. Бейер.

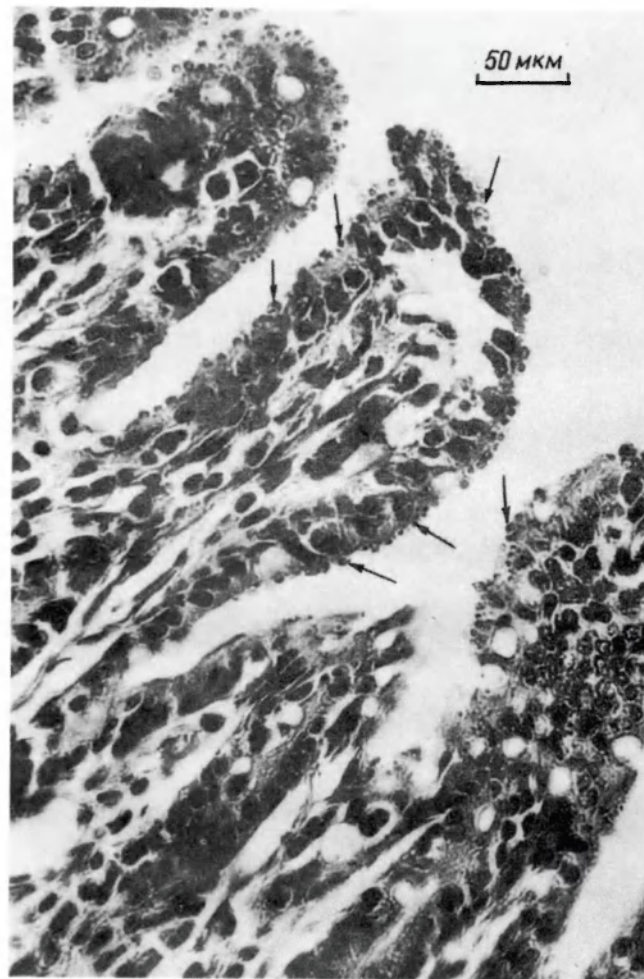


Рис. 5. Массивная колонизация ворсинок и крипт подвздошной кишки 2-недельного крысенка эндогенными стадиями развития *C. parvum* через 96 ч после заражения ооцистами, очищенными в градиенте плотности перколлы.

Стрелки — места локализации паразита.

Fig. 5. Massive colonisation of villi and crypts of intestine of a 2 week old rat with endogenous stages of *C. parvum* 96 hours after the infection with oocysts cleaned in a percoll discontinuous density gradient.